

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-167080

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月27日

C 12 N 15/40  
 //(C 12 N 15/40  
 C 12 R 1:92)

ZNA

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 キュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1 遺伝子

⑰ 特 願 昭63-320015

⑱ 出 願 昭63(1988)12月19日

特許法第30条第1項適用 昭和63年12月10日 日本分子生物学会年会準備委員会発行の「日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

⑲ 発 明 者 鈴木 正彦 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株式会社植物工学研究所内

⑲ 発 明 者 早川 孝彦 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株式会社植物工学研究所内

⑳ 出 願 人 農業生物遺伝子構造解析技術研究組合 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6階 社団法人農林水産技術情報協会内

㉑ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

## 明 細 書

## 1 発明の名称

キュウリモザイクウイルスのゲノムRNA  
 1 遺伝子

## 2 特許請求の範囲

(1) 下記のアミノ酸配列で表される蛋白質をコードするキュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1 遺伝子。

10  
 MetAlaThrSerSerPheAsnIleAsnGluLeuValAlaSer  
 20  
 HisGlyAspLysGlyLeuLeuAlaThrAlaLeuValAspLys  
 30 40  
 AlaAlaHisGluGlnLeuGluGlnGlnLeuGlnHisGlnArg  
 50  
 ArgGlyArgLysValTyrValArgAsnValLeuSerValLys  
 60 70  
 AspSerGluValIleArgAsnArgTyrGlyGlyLysTyrAsp  
 80  
 LeuHisLeuThrGlnGlnGlnPheAlaProHisGlyLeuAla  
 90  
 GlyAlaLeuArgLeuCysGluThrLeuAspCysLeuAspSer  
 100 110  
 PheProSerSerGlyLeuArgGlnAspLeuValLeuAspPhe  
 120  
 GlyGlySerTrpValThrHisTyrLeuArgGlyHisAsnVal  
 130 140  
 HisCysCysSerProCysLeuGlyIleArgAspLysMetArg  
 150  
 HisThrGluArgLeuMetAsnMetArgLysIleIleLeuAsn  
 160  
 AspProGlnGlnPheAspGlyArgGlnProAspPheCysThr

170 180  
 HisProAlaAlaAspCysLysValGlnAlaHisPheAlaIle  
 190  
 SerIleHisGlyGlyTyrAspMetGlyPheArgGlyLeuCys  
 200 210  
 GluAlaMetAsnAlaHisGlyThrThrleuLeuLysGlyThr  
 220  
 MetMetPheAspGlyAlaMetMetPheAspAspGlnGlyIle  
 230  
 IleProGluLeuAsnCysGlnTrpArgLysIleArgAsnAla  
 240 250  
 PheSerGluThrGluAspValThrProLeuValGlyLysLeu  
 260  
 AsnSerThrValPheSerArgValArgLysPheLysThrLeu  
 270 280  
 ValAlaPheAspPheIleAsnGluSerThrMetSerTyrVal  
 290  
 HisAspTrpGluAsnIleLysSerPheLeuThrAspGlnThr  
 300  
 TyrSerTyrLysGlyMetThrTyrGlyIleGluArgCysVal  
 310 320  
 IleAsnAlaGlyIleMetThrTyrLysIleIleGlyValPro  
 330  
 GlyMetCysProProGluLeuIleArgHisCysIleTrpPhe  
 340 350  
 ProSerIleLysAspTyrValGlyLeuLysIleProAlaSer  
 360  
 GlnAspLeuValGluTrpLysThrValArgIleLeuThrSer  
 370  
 ThrLeuArgGluThrGluGluIleAlaMetArgCysTyrAsn  
 380 390  
 AspLysLysAlaTrpMetGluGlnPheLysValIleLeuGly  
 400  
 ValLeuSerAlaLysSerSerThrIleValIleAsnGlyMet  
 410 420  
 SerMetGlnSerGlyGluArgIleAspIleAsnAspTyrHis  
 430  
 TyrIleGlyPheAlaIleLeuLeuHisThrLysMetLysTyr  
 440  
 GluGlnLeuGlyLysMetTyrAspMetTrpAsnAlaSerSer

450 460  
 IleSerLysTrpPheAlaAlaLeuThrArgArgArgValPhe  
 470  
 PheSerSerAlaValHisAlaLeuPheProThrLeuArgPro  
 480 490  
 ArgGluGluLysGluPheLeuIleLysLeuSerThrPheVal  
 500  
 ThrPheAsnGluGluCysSerPheAspGlyGlyGluGluTrp  
 510  
 AspValIleSerSerAlaAlaTyrValAlaThrGlnAlaVal  
 520 530  
 ThrAspGlyLysValLeuAlaAlaGlnLysAlaGluLysLeu  
 540  
 AlaGluLysLeuAlaGlnProValAspGluValSerAspSer  
 550 560  
 ProGluValProSerSerThrProAspAspThrAlaAspVal  
 570  
 CysGlyLysGluGlnGluValSerGluLeuAspSerLeuSer  
 580  
 AlaGlnThrArgSerProIleThrArgValAlaGluArgAla  
 590 600  
 ThrAlaMetLeuGluTyrAlaAlaTyrGluLysGlnLeuHis  
 610  
 AspThrThrValSerAsnLeuLysArgIleTrpAsnMetAla  
 620 630  
 GlyGlyAspAspLysArgAsnSerLeuGluGlyAsnLeuLys  
 640  
 PheValPheAspThrTyrPheThrValAspProMetValAsn  
 650  
 IleHisPheSerThrGlyArgTrpMetArgProValProGlu  
 660 670  
 GlyIleValTyrSerValGlyTyrAsnGluArgGlyLeuGly  
 680  
 ProLysSerAspGlyGluLeuPheIleValAsnSerGluCys  
 690 700  
 ValIleCysAsnSerGluSerLeuSerAlaValThrArgSer  
 710  
 LeuGlnAlaProThrGlyThrIleSerGlnValAspGlyVal  
 720  
 AlaGlyCysGlyLysThrThrAlaIleLysSerIlePheGlu

730 740  
 ProSerThrAspMetIleValThrAlaAsnLysLysSerAla  
 750  
 GlnAspValArgMetAlaLeuPheLysSerSerAspSerLys  
 760 770  
 GluAlaCysAlaPheValArgThrAlaAspSerValLeuLeu  
 780  
 AsnGluCysProThrValSerArgValLeuValAspGluVal  
 790  
 ValLeuLeuHisPheGlyGlnLeuCysAlaValMetSerLys  
 800 810  
 LeuLysAlaValArgAlaIleCysPheGlyAspSerGluGln  
 820  
 IleAlaPheSerSerArgAspAlaSerPheAspMetArgPhe  
 830 840  
 SerLysIleIleProAspGluThrSerAspAlaAspThrThr  
 850  
 PheArgSerProGlnAspValValProLeuValArgLeuMet  
 860  
 AlaThrLysAlaLeuProLysGlyThrHisSerLysTyrThr  
 870 880  
 LysTrpValSerGlnSerLysValLysArgSerValThrSer  
 890  
 ArgSerIleAlaSerValThrLeuValAspLeuAspSerSer  
 900 910  
 ArgPheTyrIleThrMetThrGlnAlaAspLysAlaSerLeu  
 920  
 IleSerArgAlaLysGluMetAsnLeuProLysThrPheTrp  
 930  
 PheTrpAsnGluArgIleLysThrValHisGluSerGlnGly  
 940 950  
 IleSerGluAspHisValThrLeuValArgLeuLysSerThr  
 960  
 LysCysAspLeuPheLysGlnPheSerTyrCysLeuValAla  
 970 980  
 LeuThrArgHisLysValThrPheArgTyrGluTyrCysGly  
 990  
 ValLeuAsnGlyAspLeuIleAlaGluCysIleAlaArgAla

(2) 下記の D N A 配列で表される キュウリ・モザ

イクウィルスのゲノム R N A 1 遺伝子。

ATGGCGAGCTCCTCGTTCAACATCAATGAATTGGTAGCCTCC  
 CACGGCGATAAAGGACTACTCGCGACCGCCCTCGTTGATAAGGC  
 AGCTCATGAGCAGCTCGAGGAGCAATTACAGCATCAACGTAGGG  
 GCGGTAAGGTCTACGTTGGGAACGTTCTGAGCGTAAAGGATTCC  
 GAAGTTATTCCGAATCGGTATGGAGGGAAGTACGACCTCCATCT  
 TACCCAGCAGGAGTTTGCTCCCCACGGCCTAGCTGGTCCCTCC  
 GCTTGTGTGAACTCTCGATTGTCTAGACTCTTCCCTTCTTCA  
 GGTCTGCGGCAGGACCTCGTCTTAGACTTCGGAGGAAGTTGGGT  
 CACACATTACCTCCGGGACATAACGTACACTGCTGTTCCCTT  
 GTTGGGTATCCGTGATAAAATGCGCCACACGGAACGTTTGATG  
 AACATGCGCAAGATCATCTTGAACGATCCACAACAGTTCGATGG  
 TCGACAGCCGGACTTCTGCACTCATCCTGCTGCTGATTGCAAG  
 TACAAGCCCACTTTGCTATATCTATTATGAGGTTATGATATG  
 GGCTTTAGAGGATTATGTGAGGCAATGAATGCTCAGGAACAC  
 CATTTTGAAGGGAACGATGATGTTGGATGGTGGATGATGTTTG  
 ACGACCAAGGTATAATTCCCGAAGTTAACTGCCAGTGGAGGAAG  
 ATTAGGAACGCTTTCTCGGAACGTAAGACGTCACACCGTTAGT  
 TGGTAAACTTAATCCACAGTGTTCCTCCGCGTGGTAAATTCA  
 AGACTTTAGTAGCTTTGATTTTCAATTAACGAATCTACTATGCTC

TATGTCCATGATTGGGAGAACATAAAATCTTTCCTAACGGACCA  
 GACTTATTCCTACAAAGGAATGACTTACGGTATTGAACGTTGTG  
 TCATCAATGCTGGTATTATGACGTACAAGATTATCGGAGTACCT  
 GGGATGTGCCACCCGAACCTATTGACATTGTATCTGGTTCCC  
 CTCTATTAAGACTATGTTGGTCTAAAGATTCCCGCGTCCGAGG  
 ATCTAGTTGAGTGCAAAACAGTGGTATTTTAACGTCAACATTG  
 CGTGAAACTGAAGAGATTGCTATGAGGTGTTACAATGATAAGAA  
 GCGGTGGATGGAACAATTTAAGGTTATCTTAGGTGTTCTATCTG  
 CTAATCATCTACATTGTTATCAATGGTATGTCCATGCACTCT  
 GCGGAACGGATAGACATCAATGATTATCATTACATTGGGTTCGG  
 TATTCTTCTTCACACAAAATGAAATATGAGCAGCTAGGGAAAA  
 TGTATGATATGTGGAATGCTTCGAGTATTTTGAAGTGGTTTGCA  
 GCGTTGACTCGTGGTCCGCTGTTTTCTCTAGTGGTGTTCATGC  
 GCTGTTCCCGACTTTGAGACCCCGTGAGGAAAAAGAATTCCTGA  
 TTAAGCTCTCCACCTTCGTAACTTTTAATGAAGAGTGTCTATT  
 GATGGTGGAGAGGAATGGGACGTGATATCATCTGCTGCATACGT  
 TGCTACACAGGCTGTTACTGATGGGAAGTTTTGGCTGGCAGAA  
 AAGCCGAGAAGCTCGCTGAGAAGCTTGACACAACCCGTAGATGAG  
 GTATCAGACAGCCCTGAGGTGCCATCTTCAACACCCGATGATAC  
 TGCCGATGTTTGTGGAAGGAGCAAGAAGTTTCGGAACCTTGACT

CATTGTGGCTCAGACACGTTCCCCCATCACTAGAGTTGCTGAA  
 AGGGCTACTGCCATGCTGGAGTATGCCGCTTATGAGAAACAGCT  
 GCATGATACCACAGTGTCCAATCTGAAACGTATTTGGAATATGG  
 CGGGCGGTGATGACAAGAGAAATTCCTCGAGGGTAATCTGAAG  
 TTGTTTTTCGACACGTATTTTACTGTTGACCCCATGGTGAACAT  
 TCACTTTTTCGACGGGTGATGGATGGTGCTCTGTGCCTGAGGGAA  
 TTGTCTACTCTGTTGGTTATAATGAACGCGGTTTAGGTCCGAAG  
 TCTGATGGAGAGCTTTTCATTGTCAATAGTGAGTGCGTGATATG  
 TAATAGCGAGTCTTTTATCTGTCTGACGCGCTCTCTTCAAGCTC  
 CGACTGGAACCATTAGTCAAGTTGACGGGGTGGCTGGTTGTGGG  
 AAAACCACGGCAATTAATCCATTTTTGAGCCGTCCACTGACAT  
 GATCGTTACCGCAATAAGAAGTCCGCTCAAGATGTGCGCATGG  
 CACTTTTCAAAATCGTCAGACTCCAAAGAAGCATGCGCCTTTGTT  
 CGAACAGCCGATTCTGTCTACTTAAATGAATGTCCGACTGTGAG  
 TAGGGTTTTGGTTGATGAGGTGCTGTACTACATTTTGGTCAAC  
 TGTGTGCTGTCTATGTCTAACTGAAGGCTGTGCGAGCTATATGT  
 TTTGGGGATTGGGAGCAGATTGCTTTTTCTTCTCGAGACGCCCTC  
 GTTTGATATGCGTTTCTCTAAATTTATTCCTGACGAACTAGTG  
 ATGCGGACACCACATTCCGTAGTCCACAAGACGTTGTGCCGCTT  
 GTGCGTTTAAATGGCTACGAAGGCCCTTCCGAAAGGAACCCATT

CMVは、3種の粒子より成る一本鎖RNAウイルスとして知られている。ゲノムRNAは、通常、鎖長が約3,300塩基のRNA1、約3,000塩基のRNA2、約2,000塩基のRNA3及び約1,000塩基のRNA4の4本であるが、更に小さなRNA（サテライトRNA）を含むものもある。RNA1はウイルスのH成分に、RNA2及びサテライトRNAはL成分に、そして、RNA3及びRNA4はM成分に存在している。

RNA1及びRNA2には、RNAの複製に必要なRNAレプリカーゼがコードされており、RNA3には、外被蛋白質とウイルスが細胞間を移動するのに必要な蛋白質（3A蛋白質）がコードされている。RNA4は、RNA3の亜ゲノムであって、外被蛋白質がコードされている。サテライトRNAは、ウイルスの増殖や複製には関与していないが、植物の病徴発現の強さに関係があるといわれている。

CMVの宿主範囲は非常に広く、例えば、39科117種以上の植物に感染する系統もある。日

AAAAACACGAAATGGGTTTCTCAATCTAAAGTGAAGAGATCTG  
 TCACATCCCGTTCTATTGCTAGTGTGACATTGGTCCACCTGGAT  
 TCTTCTAGGTTTTATCATCAGGATGACTCAAGCTGATAAAGCTTC  
 ACTGATTTCAAGGGCGAAAGAGATGAAGTTACCAAAGACTTTCT  
 GGAACGAAAGGATTAACAAACCGTACATGAATCTCAAGGTATTTCT  
 GAAGATCACGTTACTTTGGTAAGATTAAAGAGCACAAAGTGTGA  
 CCTGTTCAAACAGTTTTCTTATTGTCTTGTGCTTGTGACTAGAC  
 ATAAGGTCACATTCCGCTACGAGTATTGTGGTGTATTGAACGGC  
 GATTGATCGCCGAATGTATTGCTCGTGCT

### 3 発明の詳細な説明

#### （産業上の利用分野）

本発明は、キュウリモザイクウイルス（以下、「CMV」という。）のゲノムRNAの内、分子量が最大のRNA1がコードする遺伝子に関するものである。

（従来の技術及び発明が解決しようとする問題点）

従来、植物ウイルスとして、タバコモザイクウイルス（以下、「TMV」という。）やCMV等が知られている。これら植物ウイルスは、農作物に病害を与え大きな減収要因となっている。

本国内においては、普通系統（CMV-O）、黄斑系（CMV-Y）による被害が最も大きく、その他に数系統のCMVが知られている。これまでウイルス病に対する有効な防除手段は少なく、TMVにおいて弱毒ウイルスによる干渉作用を利用するものがトマトに用いられているにすぎない。

近年、ウイルスの外被蛋白質をコードしている遺伝子のcDNAを合成し、それをTiプラスミドに組み込んで植物に導入することによって干渉作用をおこさせる試みがなされ、ウイルス耐性植物を作出することに成功している〔サイエンス (Science), 232, 738-743, 1986; バイロロジー (Virology), 159, 299-305, 1987; イーエムピーオージャーナル(EMBO J.), 6, 1845-1851, 1987; EMBO J., 7, 1273-1280, 1988; バイオテクノロジー (Bio/technology), 6, 549-557, 1988]。また、CMVのサテライトRNAを植物に導入することによって、ウイルス耐性植物を得たことが報告されている〔ネイチャー (Nature), 328, 799-802, 1987]。

さらに、アンチセンスRNAを利用したウイルス防除の方法が、微生物を用いた実験系では成功しており[Nature, 315, 601-603, 1985]、植物への応用が期待されている。即ち、ウイルスに基本的な蛋白質の合成や核酸の複製を、センスRNAとそれに相補的なアンチセンスRNAの間にハイブリッドを形成させることにより抑制しようというものである。この技術の確率には、アンチセンスRNAの安定性や、標的とする遺伝子選抜に対する評価が重要である。実際、外被蛋白質にたいするアンチセンスRNAを植物につくらせる試みが成されているが[EMBO J., 7, 1273-1280, 1988; Bio/technology, 6, 549-557, 1988]、有効なウイルス耐性植物を得るには至っていない。これは、外被蛋白質をコードしているRNA 4のin vivoでの合成量がアンチセンスRNAの合成量に対して大きすぎるためと思われる。

RNA 1はRNA 2と共にRNAレプリカーゼをコードしている。RNAレプリカーゼは、ウイルスの複製に重要な酵素であり、この蛋白質の合

成を抑制することはウイルスの増殖を抑えるのに効果的と考えられる。しかも、in vivoでの翻訳量は外被蛋白質と比べて少ないことから、より効果的にセンスRNAの働きを抑えると期待される。

そこで、本発明者らは、CMVのRNA 1にコードされている遺伝子を得るべく検討を行った。

従来、オーストラリアのCMV-Q系統についてはRNA 1-4の塩基配列が決定されている

[ヨーロッパジャーナルオブバイオケミストリー(Eur. J. Biochem.), 143, 277-278, 1984; 同150, 331-339, 1985]が、国内系統のものについては、本発明者らが、CMV-OのRNA 3について報告している(特願昭62-124748号、同62-168150号)が、それ以外は未だ知られていない。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、今般、国内系統のCMVのRNA 1にコードされている遺伝子を取得するに至り、本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は、特定されたアミノ酸配

列で表される蛋白質をコードするキュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1遺伝子に存する。

以下本発明を説明する。

本発明においては、CMV-Oをタバコ葉、キュウリ葉等に接種して、25-27℃で一週間から十日間程度ウイルスを増殖させた後凍結する。凍結した感染葉を粉砕し、更にワーリングブレンダー等で適当な緩衝液中で破砕する。得られた破砕液を13,000xgで10分間程度遠心して残渣と下層のクロロホルム層を除去し、上層(水層)を150,000xgで90分間程度遠心する。沈澱を適当な緩衝液に懸濁し、トリトンX-100を加えて140,000xgで90分間程度遠心し、ウイルス粒子を含む画分を沈澱として得る。更に、塩化セシウムの密度勾配遠心によりウイルス粒子を分離精製する。こうして得たウイルス粒子より常法に従ってRNAを単離精製する。

RNA 1-4の混合液を用いてcDNAを合成する。まず、RNAの3'末端の塩基配列を直接シーケンスにより決定し、これよりプライマー

を合成する。全RNAを鋳型として、逆転写酵素を使用して常法に従い、cDNAを合成する。得られるcDNAは、1本鎖であるので、これを鋳型として常法に従い2本鎖cDNAを合成する。これをpUC系統[ジーン(Gene), 19, 259-268, 1982; Gene, 33, 103-119, 1985]や、M13mp系統[メリッツインエンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 101, 20-77, 1983]等のベクターに導入し、大腸菌(HB101やJM109等)に形質転換してクローニングする。得られたクローンが、4本のRNAのどれに対応するか調べるために、各クローンをプローブとしてCMVの全RNAを鋳型としてノーザンハイブリダイゼーション(northern hybridization)を行う。かくして、目的のゲノム-RNA 1-にハイブリダイズするクローンを選ぶことができる。

(発明の効果)

本発明のRNA 1がコードする遺伝子は、CMVに対して抵抗性の植物を作出するのに有効と考えられる。

## (実施例)

以下に実施例を挙げて具体的に本発明を説明する。

## 実施例

## (1) CMV-Oの純化とウイルスRNAの単離

① CMV-O接種後、25～27℃の温度で1週間から10日間保持したタバコ葉(KY-57)100gを凍結した。凍結した感染葉を木槌で粉碎後、10mMEDTAを含む0.5Mクエン酸緩衝液(pH6.5)100mlとクロロホルム100mlを加え、ワーリングブレンダー(約15,000rpm)で破碎した。この破碎液を、13,000×gで10分間遠心し、上層(水層)をさらに150,000×gで90分間遠心した。得られた沈殿に、1mMEDTAを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)10mlを加え、テフロンホモゲナイザーで十分に懸濁均一化した。0℃で2時間以上静置した後、最終濃度で1%になるように、トリトンX-100を加えて140,000×gで90分間遠心し、沈殿を上記のリン酸緩衝液1

mlに懸濁した。これを塩化セシウムの段階的な密度勾配(20,30,40,50%w/v、各1ml)に重層し、240,000×gで4時間遠心した。白い帯が肉眼で確認できるので、この画分を集めさらに140,000×gで90分間遠心し、沈殿を上記のリン酸緩衝液1mlに懸濁した。

② 上記の方法で得たウイルス懸濁液に、最終濃度で1%SDS、12.5mg/mlベントナイトとなるように加え、さらにフェノールを等量加えて蛋白質を除去後、常法に従ってエタノール沈殿をくり返してRNAを単離精製した。この方法で、感染葉100gより約2mgのRNAを得た。

## (2) RNA1の3'末端の塩基配列の決定

① 3'末端の標識: 上記で得た4μgのCMV-ORNAを含む溶液(100mMHESPES-NaOH(pH7.5)/100mM MgCl<sub>2</sub>/100mMDTT/0.1%(w/v)BSA/2mMATP/10%(v/v)DMSO)に50μCiのCytidine3',5'-[5'-<sup>32</sup>P]bisphosphateと大腸菌T4RNAリガーゼ(10unit)を加え、4℃で16時間反応させ、R

NA3'末端に標識した。フェノールで蛋白質を除去後、エタノール沈殿でRNAを回収し、8M尿素を含む24%ポリアクリルアミドゲルにのせ電気泳動を行った。120Vの定電圧で色素マーカーが抜け出るまで泳動し、オートラジオグラフィでRNAバンドの位置を確認後、目的の鎖長が約3,300塩基のRNA1を常法に従ってゲルより切り出して回収した。

② 科学修飾によるRNA塩基配列の決定: Peattieの方法【プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 1760-1764, 1979】に従った。即ち、ジメチル硫酸でグアニンを、ジエチルピロカーボネートでアデニンを化学修飾し、また、シチジンとウリジンを、塩濃度を変えてヒドラジンで化学修飾した。これらを酸性条件下(pH4.5)でアニリンを用いて切断後、8M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲルにのせ電気泳動し、オートラジオグラフィをとり塩基配列を決定した。

CMV-ORNA1の3'端より18個の塩基配列を以下に示した。

3'-ACCAGAGGA<sup>5</sup>AA<sup>10</sup>ACCUC<sup>15</sup>GG-5'

この配列は、CMV-ORNA2、RNA3と全く等しかった。

## (3) cDNAの合成

20μlの緩衝液(50mM Tris-HCl, pH8.3, 0.15MKCl)に鋳型RNAとして、上記(1)で得た全RNA(12μg)と、プライマーとして、上記(2)で決定した3'末端配列に相補的な合成DNAを過剰量(0.4μg)溶かして極細のガラス管に封入し、これを90℃に加熱した後除冷することにより、RNAとプライマーを会合させた。この溶液を最終濃度が100μl中、50mMTris-HCl, pH8.3/10mM MgCl<sub>2</sub>/10mMDTT/100μg/ml CMV-ORNAとなるようにした後、4種のデオキシスクレオチド3リン酸を1mMになるように加え、100unitの逆転写酵素を加えて42℃で90分間反応を行ない、cDNAの一本鎖目を合成した。フェノール抽出、エ

タノール沈殿の後、100  $\mu$ l の緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 5 mM MgCl<sub>2</sub> / 100 mM KCl / 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / 150 mM NaCl / 50  $\mu$ g / ml BSA) に溶かし、さらに、4 種のデオキシリボスクレオチド3リン酸を40  $\mu$ Mになるよう加えた。これにRNase H (10 unit)、大腸菌リガーゼ (10 unit)、大腸菌DNAポリメラーゼ I (250 unit) を加え、12  $^{\circ}$ C で60分間、次いで22  $^{\circ}$ C で75分間反応を行ない、二本鎖cDNAを合成した。フェノール抽出、エタノール沈殿で核酸を回収する。

これを緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 10 mM EDTA / 80  $\mu$ M Adenosyl methionine / 400  $\mu$ g / ml BSA) 40  $\mu$ l に溶かし、EcoRI methylase (40 unit) を加えて37  $^{\circ}$ C で1時間反応を行ないEcoRI部位をメチル化した。フェノール抽出、エタノール沈殿の後、T4ポリメラーゼで平滑末端にした後 (33 mM Tris-acetate, pH 7.9 / 66 mM KCH<sub>3</sub>COO / 10 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> / 0.5 mM DTT / 0.1 mg / ml BSA, 37  $^{\circ}$ C、1時

トセル100  $\mu$ lに加え、水中で30分間静置した後、アンピシリン (30  $\mu$ g / ml) を含むLB寒天培地で選抜し、アンピシリン耐性コロニーを得た。この中から、アルカリ-SDS法でミニスクリーニングを行ない、2.0 Kbp前後の挿入DNAを持つクローンをいくつか得た。これらのクローンよりプラスミドDNAを抽出し、EcoRIフラグメントを回収した。これらのフラグメントをプローブとし、CMVの前RNAを鋳型として常法に従いノーザンブロッティング northern blotting を行なった。3つのクローンがRNA1と強くハイブリダイズし、RNA1のDNAを得ることができた。最長、2.5 Kbpのクローンを得ることができた。残りの部分は、シーケンスを決めた後適当な合成プライマーを作り、プライマーエクステンションを行なって、ほぼ全長をカバーするcDNAを得た。

上記(4)で得たクローンからEcoRIフラグメントを切り出し、M13mp18にサブクローニングし

間)、EcoRI リンカーライゲーションを宝酒造社製ライゲーションキットを用いて行なった。

フェノール抽出、エタノール沈殿で核酸を回収した後、EcoRI (10 unit) を反応させた (37  $^{\circ}$ C、1時間)。水を加えて50  $\mu$ lにし、5-15%のNaClグラジエント (5 ml) に重層、170,000  $\times$  g で4時間遠心した。これを分画し、鎖長が1 Kbp以上の部分 (上層より約3.7 ml) をエタノール沈殿により回収した。これを常法に従ってベクターpBR322のEcoRI部位に挿入した。

#### (4) クローニング

形質転換は、Hanahan の方法 [ディーエヌエークローニング (DNA cloning), vol 1, pp109-136, 1985] を改良したものに従った。大腸菌HB101 を0.1 M KCl / 45 mM MnCl<sub>2</sub> / 10 mM CaCl<sub>2</sub> / 10 mM KCH<sub>3</sub>COO / 10%グリセロール / 3 mM塩酸ヘキサコバラミンを含むpH 6.4の緩衝液で0  $^{\circ}$ C で処理し、さらにDMSOを最終濃度が7%になるように加え、コンピテントセルを調製した。上記(3)で得たDNA溶液5-10  $\mu$ lをコンピテン

た。両方向に挿入されたクローンを選抜し、宝酒造製キロシークエンス用デレーションキットを用いて欠損変異株を作製した。即ち、BamHI と PstI 部位で挿入DNAをもつmp18を切断後、エキソヌクレアーゼIIIと緑豆ヌクレアーゼによってDNAをBamHI部位から挿入し、DNA方向へ消化した。この反応を経時的に停止させ、平滑末端にした後、閉環した。これを上記(4)で示したように形質転換させて適当な長さの塩基配列をもつ欠損変異株を選抜した。各変異株の塩基配列は、ジデオキシ法で決定した。同様にして、プライマーエクステンションで得たcDNAの塩基配列も決定した。5'末端の塩基配列は、合成プライマーを作り、RNAの直接シーケンス [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3371-3375, 1986] により決定した。十鎖と一鎖のDNAの塩基配列は全く相補的であることを確認した。図1には、一般的な遺伝コードを用いて翻訳したRNA1の読み取り枠のアミノ酸配列を示した。

#### 4. 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で得られた + 鎖の c D N A の塩基配列を示す図面である。図中、読み取り枠は 9 1 番目から 3 0 7 2 番目のストップコドンまでである。

出願人 農業生物遺伝子構造解析技術研究組合

代理人 弁理士 長 谷 川 一

ほか 1 名

図 1 (その 1)

```

      10      20      30      40      50      60      70
GTTTTATTTACAAGAGCGTACGGTTCAACCCCTGCCTCCTCTGTAAAACTACCCTTTGAAAACCTCTCTTTC

      82      92     102     112     122     132     142
TTAATCTTTTCTTTGTAAATTCCTATGGCGACGTCCTCGTTCAACATCAATGAATTGGTAGCCTCCCACGGC
      MetAlaThrSerSerPheAsnIleAsnGluLeuValAlaSerHisGly

      154     164     174     184     194     204     214
GATAAAGGACTACTCGCGACCGCCCTCGTTGATAAGGCAGCTCATGAGCAGCTCGAGGAGCAATTACAGCAT
AspLysGlyLeuLeuAlaThrAlaLeuValAspLysAlaAlaHisGluGlnLeuGluGluGlnLeuGlnHis

      226     236     246     256     266     276     286
CAACGTAGGGGCCGTAAGGTCTACGTTTCGGAACGTTCTGAGCGTAAAGGATTCCGAAGTTATTCGGAATCGG
GlnArgArgGlyArgLysValTyrValArgAsnValLeuSerValLysAspSerGluValIleArgAsnArg

      298     308     318     328     338     348     358
TATGGAGGGAAGTACGACCTCCATCTTACCCAGCAGGAGTTTGCTCCCGACGGCCTAGCTGGTGGCCTCCGC
TyrGlyGlyLysTyrAspLeuHisLeuThrGlnGlnGluPheAlaProHisGlyLeuAlaGlyAlaLeuArg

      370     380     390     400     410     420     430
TTGTGTGAAACTCTCGATTGTCTAGACTCTTTCCTTCTTCAGGTCTGCGGCAGGACCTCGTCTTAGACTTC
LeuCysGluThrLeuAspCysLeuAspSerPheProSerSerGlyLeuArgGlnAspLeuValLeuAspPhe

      442     452     462     472     482     492     502
GGAGGAAGTTGGGTACACATTACCTCCGCGGACATAACGTACACTGCTGTTCCCTTGTGGGTATCCGT
GlyGlySerTrpValThrHisTyrLeuArgGlyHisAsnValHisCysCysSerProCysLeuGlyIleArg

      514     524     534     544     554     564     574
GATAAAATGCGCCACACGGAACGTTTGATGAACATGCGCAAGATCATCTTGAACGATCCACAACAGTTTCGAT
AspLysMetArgHisThrGluArgLeuMetAsnMetArgLysIleIleLeuAsnAspProGlnGlnPheAsp

```

図 1 (その2)

586 596 606 616 626 636 646  
 GGTGACAGCCGGACTTCGCACTCATCCTGCTGCTGATTGCAAAGTACAAGCCCACTTGTCTATATCTATT  
 GlyArgGlnProAspPheCysThrHisProAlaAlaAspCysLysValGlnAlaHisPheAlaIleSerIle  
 658 668 678 688 698 708 718  
 CATGGAGGTTATGATATGGGCTTTAGAGGATTATGTGAGGCAATGAATGCTCACGGAACCACCATTTTGAAG  
 HisGlyGlyTyrAspMetGlyPheArgGlyLeuCysGluAlaMetAsnAlaHisGlyThrThrIleLeuLys  
 730 740 750 760 770 780 790  
 GGAACGATGATGTTTCGATGGTGGCGATGATGTTTGACGACCAAGGTATAATTCCCGAACTTAAGTCCAGTGG  
 GlyThrMetMetPheAspGlyAlaMetMetPheAspAspGlnGlyIleIleProGluLeuAsnCysGlnTrp  
 802 812 822 832 842 852 862  
 AGGAAGATTAGGAACGCTTTCTCCGAAACTGAAGACGTCACACCGTTAGTTGGTAAACTTAATCCACAGTG  
 ArgLysIleArgAsnAlaPheSerGluThrGluAspValThrProLeuValGlyLysLeuAsnSerThrVal  
 874 884 894 904 914 924 934  
 TTTTCCCGCGTGCGTAAATTCAAGACTTTAGTAGCTTTGATTTCATTAAACGAATCTACTATGTCTTATGTC  
 PheSerArgValArgLysPheLysThrLeuValAlaPheAspPheIleAsnGluSerThrMetSerTyrVal  
 946 956 966 976 986 996 1006  
 CATGATTGGGAGAACATAAAATCTTCTTAACGGACCACTTATTCTACAAAGGAATGACTTACGGTATT  
 HisAspTrpGluAsnIleLysSerPheLeuThrAspGlnThrTyrSerTyrLysGlyMetThrTyrGlyIle  
 1018 1028 1038 1048 1058 1068 1078  
 GAACGTTGTGTCAATGCTGGTATTATGACGTACAAGATTATCGGAGTACCTGGGATGTGCCACCCGAA  
 GluArgCysValIleAsnAlaGlyIleMetThrTyrLysIleIleGlyValProGlyMetCysProProGlu  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150  
 CTCATTGACATTGTATCTGGTCCCTCTATTAAAGACTATGTTGGTCTAAAGATTCCCGCGTCGCAGGAT  
 LeuIleArgHisCysIleTrpPheProSerIleLysAspTyrValGlyLeuLysIleProAlaSerGlnAsp

図 1 (その3)

1162 1172 1182 1192 1202 1212 1222  
 CTAGTTGAGTGGAACAGTGCGTATTTTAACGTCAACATTGCGTGAAACTGAAGAGATTGCTATGAGGTGT  
 LeuValGlnTrpLysThrValArgIleLeuThrSerThrLeuArgGluThrGluGluIleAlaMetArgCys  
 1234 1244 1254 1264 1274 1284 1294  
 TACAATGATAAGAAGCGTGGATGGAACAATTTAAGGTTATCTTAGGTGTTCTATCTGCTAAATCATCTACC  
 TyrAsnAspLysLysAlaTrpMetGluGlnPheLysValIleLeuGlyValLeuSerAlaLysSerSerThr  
 1306 1316 1326 1336 1346 1356 1366  
 ATTGTTATCAATGGTATGTCCATGCAGTCTGGCGAACGGATAGACATCAATGATTATCATTACATTGGGTTT  
 IleValIleAsnGlyMetSerMetGlnSerGlyGluArgIleAspIleAsnAspTyrHisTyrIleGlyPhe  
 1378 1388 1398 1408 1418 1428 1438  
 GCTATTCTTCTTACACAAAAATGAAATATGAGCAGCTAGGGAAAAATGTATGATATGTGGAATGCTTCGAGT  
 AlaIleLeuLeuHisThrLysMetLysTyrGluGlnLeuGlyLysMetTyrAspMetTrpAsnAlaSerSer  
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510  
 ATTTGCAAGTGGTTTGCAGCGTTGACTCGTCGTCGCGTGTCTTCTAGTGCTGTTTCATGCGCTGTTCCCG  
 IleSerLysTrpPheAlaAlaLeuThrArgArgArgValPhePheSerSerAlaValHisAlaLeuPhePro  
 1522 1532 1542 1552 1562 1572 1582  
 ACTTTGAGACCCCGTGAGGAAAAAGAATTCCTGATTAAAGCTCTCCACCTTCGTAACCTTTAATGAAGAGTGC  
 ThrLeuArgProArgGluGluLysGluPheLeuIleLysLeuSerThrPheValThrPheAsnGluGluCys  
 1594 1604 1614 1624 1634 1644 1654  
 TCATTTGATGGTGGAGAGGAATGGGACGTGATATCATCTGCTGCATACGTTGCTACACAGGCTGTTACTGAT  
 SerPheAspGlyGlyGluGluTrpAspValIleSerSerAlaAlaTyrValAlaThrGlnAlaValThrAsp  
 1666 1676 1686 1696 1706 1716 1726  
 GGGAAAGTTTTGGCTGCGCAGAAAGCCGAGAAGCTCGCTGAGAAGCTTGACAACCCGTAGATGAGGTATCA  
 GlyLysValLeuAlaAlaGlnLysAlaGluLysLeuAlaGluLysLeuAlaGlnProValAspGluValSer



図 1 (その4)

1738 1748 1758 1768 1778 1788 1798  
 GACAGCCCTGAGGTGCCATCTTCAACACCCGATGATACTGCCGATGTTTGTGGAAAGGAGCAAGAAGTTTCG  
 AspSerProGluValProSerSerThrProAspAspThrAlaAspValCysGlyLysGluGlnGluValSer  
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870  
 GAACTTGACTCATTGTCGGCTCAGACACGTTCCCCCATCACTAGAGTTGCTGAAAGGGCTACTGCCATGCTG  
 GluLeuAspSerLeuSerAlaGlnThrArgSerProIleThrArgValAlaGluArgAlaThrAlaMetLeu  
 1882 1892 1902 1912 1922 1932 1942  
 GAGTATGCCGCTTATGAGAAACAGCTGCATGATACCACAGTGTCCAATCTGAAACGTATTTGGAATATGGCG  
 GluTyrAlaAlaTyrGluLysGlnLeuHisAspThrThrValSerAsnLeuLysArgIleTrpAsnMetAla  
 1954 1964 1974 1984 1994 2004 2014  
 GCGGGTGATGACAAGAGAAATTCCTCGAGGGTAATCTGAAGTTCGTTTTCGACACGTATTTTACTGTTGAC  
 GlyGlyAspAspLysArgAsnSerLeuGluGlyAsnLeuLysPheValPheAspThrTyrPheThrValAsp  
 2026 2036 2046 2056 2066 2076 2086  
 CCCATGGTGAACATTCACTTTTTCGACGGGTCGATGGATGCGTCCTGTGCCTGAGGGAATTGTCTACTCTGTT  
 ProMetValAsnIleHisPheSerThrGlyArgTrpMetArgProValProGluGlyIleValTyrSerVal  
 2098 2108 2118 2128 2138 2148 2158  
 GGTTATAATGAACGCGGTTTAGGTCCGAAGTCTGATGGAGAGCTTTTCATTGTCAATAGTGAGTGCGTGATA  
 GlyTyrAsnGluArgGlyLeuGlyProLysSerAspGlyGluLeuPheIleValAsnSerGluCysValIle  
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230  
 TGTAAATAGCGAGTCTTTATCTGCTGTACGCGCTCTCTTCAAGCTCCGACTGGAACCATAGTCAAGTTGAC  
 CysAsnSerGluSerLeuSerAlaValThrArgSerLeuGlnAlaProThrGlyThrIleSerGlnValAsp  
 2242 2252 2262 2272 2282 2292 2302  
 GGGGTCGCTGTTGTGGGAAAACACGGCAATTAAATCCATTTTTGAGCCGTCCACTGACATGATCGTTACC  
 GlyValAlaGlyCysGlyLysThrThrAlaIleLysSerIlePheGluProSerThrAspMetIleValThr

図 1 (その5)

2314 2324 2334 2344 2354 2364 2374  
 GCGAATAAGAAGTCCGCTCAAGATGTGCGCATGGCACTTTTCAAATCGTCAGACTCCAAAGAAGCATGCGCC  
 AlaAsnLysLysSerAlaGlnAspValArgMetAlaLeuPheLysSerSerAspSerLysGluAlaCysAla  
 2386 2396 2406 2416 2426 2436 2446  
 TTTGTTGGAACAGCCGATTCTGTCTACTTAATGAATGTCCGACTGTGAGTAGGGTTTTGGTTGATGAGGTC  
 PheValArgThrAlaAspSerValLeuLeuAsnGluCysProThrValSerArgValLeuValAspGluVal  
 2458 2468 2478 2488 2498 2508 2518  
 GTGTTACTACATTTTGGTCAACTGTGTGCTGTCTAACTGAAGGCTGTGCGAGCTATATGTTTTGGG  
 ValLeuLeuHisPheGlyGlnLeuCysAlaValMetSerLysLeuLysAlaValArgAlaIleCysPheGly  
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590  
 GATTCGGAGCAGATTGCTTTTTCTTCTCGAGACGCTCGTTTGATATGCGTTTCTCTAAATATTCTCTGAC  
 AspSerGluGlnIleAlaPheSerSerArgAspAlaSerPheAspMetArgPheSerLysIleIleProAsp  
 2602 2612 2622 2632 2642 2652 2662  
 GAACTAGTGATGCGGACACCACATTCCGTAGTCCACAAGACGTTGTGCCGCTTGTGCGTTTAATGGCTACG  
 GluThrSerAspAlaAspThrThrPheArgSerProGlnAspValValProLeuValArgLeuMetAlaThr  
 2674 2684 2694 2704 2714 2724 2734  
 AAGGCCCTTCCGAAAGGAACCCATTCAAATACACGAAATGGGTTTCTCAATCTAAAGTGAAGAGATCTGTC  
 LysAlaLeuProLysGlyThrHisSerLysTyrThrLysTrpValSerGlnSerLysValLysArgSerVal  
 2746 2756 2766 2776 2786 2796 2806  
 ACATCCCGTTCTATTGCTAGTGTGACATTGGTCGACCTGGATTCTTCTAGGTTTTACATCAGATGACTCAA  
 ThrSerArgSerIleAlaSerValThrLeuValAspLeuAspSerSerArgPheTyrIleThrMetThrGln  
 2818 2828 2838 2848 2858 2868 2878  
 GCTGATAAAGCTTCACTGATTTCAAGGGCGAAAGAGATGAACCTACCAAAGACTTTCTGGAACGAAAGGATT  
 AlaAspLysAlaSerLeuIleSerArgAlaLysGluMetAsnLeuProLysThrPheTrpAsnGluArgIle

## 図1 (その6)

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950  
 AAAACCGTACATGAATCTCAAGGTATTTCTGAAGATCACGTTACTTTGGTAAGATTAAAGAGCACAAAGTGT  
 LysThrValHisGluSerGlnGlyIleSerGluAspHisValThrLeuValArgLeuLysSerThrLysCys  
 2962 2972 2982 2992 3002 3012 3022  
 GACCTGTTCAAACAGTTTTCTTATTGTCTTGTTGCTTTGACTAGACATAAGGTCACATTCCGCTACGAGTAT  
 AspLeuPheLysGlnPheSerTyrCysLeuValAlaLeuThrArgHisLysValThrPheArgTyrGluTyr  
 3034 3044 3054 3064 3074 3084 3094  
 TGTGGTGTATTGAACGGCGATTTGATCGCCGAATGTATTGCTCGTGTAGCGGTTTCCCTCCTTCGGGCGG  
 CysGlyValLeuAsnGlyAspLeuIleAlaGluCysIleAlaArgAla  
 3106 3116 3126 3136 3146 3156 3166  
 GATCTGAGTTGGCGGTAATCTACAAACCGTCTGAGGTCACATAAACGTTAACGGTTACGTTTTCGGTGAACGG  
 3178 3188 3198 3208 3218 3228 3238  
 GTTGTCCATCCAGCTTACGGCTAAAATGGTCAGTCGTGGAGAAATCCACGCCAGTAGACTTACAAGTCTCTG  
 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310  
 AGGCGCCTTTGAAACCATCTCCTAGGTTTCTTCGGAAGGACTTCTGTCCGTGTACTTCTAGTACAATGTGCT  
 3322 3332 3342 3352 3362  
 AGTTTCAGGGTACGGGTGCCCCCCTTTCGTGGGGGCTCCAAAAGGAGACCA

## 手続補正書 (自発)

平成11年7月14日

特許庁長官 吉田文毅 殿

## 1 事件の表示

昭和63年特許願第320015号

## 2 発明の名称

キュウリモザイクウイルスのゲノム

RNA1遺伝子

## 3 補正をする者

出願人

農業生物遺伝子構造解析技術研究組合

## 4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

## 6 補正の内容

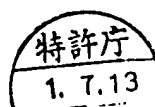
- (1) 明細書第14頁下から第6行に「ハイブリ  
ダイズ」とあるを、「ハイブリダイズ」と訂  
正する。
- (2) 同第18頁下から第9行に「除冷する」と  
あるを、「徐冷する」と訂正する。

以上

## 5 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

方式 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**